

201522014B

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の
安全性確保に関する研究

平成25～27年度 総合研究報告書
(H25-食品-一般-015)

研究代表者 近藤一成

平成28(2016)年 5月

目次

I. 総括研究報告書

次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究

近藤 一成 3

II. 分担研究報告書

1. 接ぎ木を用いた次世代遺伝子組換え技術による作物の作出とその安全性評価

原田 竹雄 9

2. 遺伝子改変法の確立と標準化に関する研究

山本 卓 21

3. 次世代遺伝子組換え技術に関する調査研究

近藤 一成 41

4. 次世代バイオ技術を応用した生物の表現系解析と検出技術の開発

中村 公亮 61

5. 統合型遺伝子組換え食品データベース作成・次世代遺伝子組換え技術を用いた作物と非食用組換え作物の検知技術の開発

吉松 嘉代

5-1 統合型遺伝子組換え食品データベース作成に関する研究 83

5-2 NBT を用いた作物と非食用遺伝子組換え作物の検知技術の開発 95

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 105

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」

平成 25～27 年度 総合総括研究報告書

研究代表者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究分担者	原田竹雄	弘前大学 農学生命科学部
研究分担者	山本 卓	広島大学大学院 理学研究科
研究分担者	吉松嘉代	医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
研究分担者	中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

研究要旨

次世代の組換え技術による育種法（新規育種法, NBT）を用いた農作物の開発が活発に行われている。このような次世代遺伝子組換え技術では、組換えの痕跡がゲノム DNA 上に残らないと考えられている。接ぎ木した遺伝子組換え台木から穂木（または遺伝子組換え穂木から台木）への師管輸送を介した RNA サイレンシング誘導、動植物へのゲノム編集技術、オリゴヌクレオチドを用いた 1 塩基変異誘導が代表的技術である。これらは、まだ技術的に確立されたとは言えず、その特徴や宿主に起こり得る現象、オフターゲット効果などについての十分な知見が必要である。一方、近い将来これらの技術が食品分野で普及が予測されるが、こうして作出された生物の取り扱いや GM 生物の規制の在り方、GM 生物として申請がされた場合の検討項目、さらに、検知の可能性や検知可能な場合のその方法に関する検討がなされておらず、それらの検討が急務となってきた。本研究では、次世代遺伝子組換え技術について、技術開発やその技術を用いた検討、開発状況や規制に関する情報文献調査を行った。また、検知の可能性については、次世代シーケンス技術を用いて検討した。

具体的には、(1) 技術開発では、高効率遺伝子ノックイン手法を新規に開発して、CRISPR/Cas9 や TALEN を用いた高効率遺伝子のノックインが可能であることを示した。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いたときの標的領域およびその周辺領域で起きる変異を、その頻度と配列の変化について詳細に検討した。細胞周期によっては変異頻度が大きく上昇するが、染色体異常などはなく、農業分野への利用に関して懸念されるものはないかあっても少ないと考えられた。大きな外来遺伝子をノックインしたときの周辺遺伝子発現量について検討、挿入の位置や向きにより周辺遺伝子の発現量が最大 4 桁大きく変化することを示した。接ぎ木を利用した遺伝子サイレンシング誘導では、GM 穂木から生成される低分子 RNA 分子である siRNA の台木への移行と残存性について検討し、siRNA は接ぎ木が成立している間は台木に輸送されるが、接ぎ木から分離すると siRNA は消滅して最終産物には残存しないことを明らかにした。開発状況では、ゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 の適応が多く、イネ、コムギ、トウモロコシ、トマトなど多くの作物に実施されていた。国別ではアメリカと中国の研究が大部分であった。また、オリゴヌクレオチド指向型変異導入法 (ODM) を用いたナタネがアメリカ、カナダで市場に出始めた。規制状況については、本年度末においても、EU を含めて新規育種技術 NBT について、それぞれの技術が GM 生物の規制範囲内か除外するかの判断をしていない。

A. 研究目的

遺伝子組換え (GM) 技術が急速に発展し、ZFN (Zinc-Finger Nuclease)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) などの次世代の遺伝子組換え技術が、食品分野でも急速に利用され始めた。リンゴ RNA ウイルスを用いた開花促進、接ぎ木を用いた転写型遺伝子サイレンシングなど、ゲノム上での改変を行わずに組換え生物の作成が可能になってきた (エピゲノム編集)。ゲノム編集 TALEN や CRISPR では、遺伝子上の任意の位置を人工的かつ改変した痕跡を残すことなく意図的に組換え生物を作成可能である可能性があることから、これらの組換え体をどのように扱うかを議論することが近々の課題として求められている。

次世代遺伝子組換え技術には、人工ヌクレアーゼ ZFN, TALEN, CRISPR 法のほか、RdDM や接ぎ木利用遺伝子サイレンシング、植物 RNA ウイルスを用いた遺伝子制御、1塩基変異誘導法 (ODM) などが存在する。これらについて、安全で高効率な遺伝子改変技術を確立するとともに、それぞれの技術ごとに整理し、その原理や作用機構について実際の文献情報から得られた結果や本研究での実験から得られた結果を基に、改変後の遺伝子配列の違いなどを調査・研究して、どのようなことが想定されるか、どのような場合に遺伝子組換え体 (GMO) として扱うか、GMO として扱う場合に新たに安全性審査に加える項目はあるか、などを考える必要がある。また、次世代遺伝子組換え技術を用いて作成された生物は、どこまで検知が可能かどうかについても検討を行うことが必要

である。遺伝子塩基配列上の変化については、意図しない領域での非特異的な改変 (オフターゲット、off-target 効果) がどの程度起きるか、どの程度の改変であれば自然界と区別するのか、について、改変が欠失、置換、挿入に分けて整理して考える必要がある。

本研究では、次世代遺伝子組換え技術の中で、進歩が著しいゲノム編集と接ぎ木を用いた遺伝子サイレンシングを中心に、上記観点から調査研究を行った。また、食用遺伝子組換え生物 (NBT を含む組換え生物、薬用・環境浄化等作物) などの文献調査を行うとともに、各国の規制に対する考え方、アジア地域での開発状況についても調査した。

A. 研究方法

次世代組換え技術に関する研究について、分担研究者の山本卓らのグループは、TALEN の DNA 結合モジュールを改変して高活性型 platinum TALEN を開発するとともに、Distal-MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) の DNA 修復機構を応用した新規遺伝子ノックイン法 (改良型 PITCh 法) の開発研究を行うとともに、off-target についても検討した。近藤一成らのグループは、ゲノム編集技術の中の CRISPR/Cas9 を用いて、標的領域とその周辺 7 kb について起きる変異の頻度と変化を細胞レベルで解析した。大腸菌発現リコンビナント Cas9 タンパクのアレルゲン性と毒性について検討するために、人工胃液を用いた消化性試験、熱安定性試験を行い、免疫原性を調べた。また、遺伝子組換え動物の文献調査、および、各技術の開発状況および規制に関する調査を行った。中村公亮らのグループは、外来遺伝子を導入した時に起きる現象、ゲノム構造

と周辺遺伝子発現に与える影響を検討した。吉松嘉代らのグループは、植物を対象に（特にイネを標的として）TALENを用いた時の変異解析を行うために、改変イネの作出を行った。また、次世代組換え技術を用いた植物の世界各国の開発状況について、および医薬品用途の遺伝子組換え植物の調査を継続して行った。

B. 結果および考察

1. 次世代遺伝子組換え技術開発

ゲノム編集技術では、原法のほかに様々な改良法が考案され、検討されている。そのため、実験条件によっては活性が高いものの、特異性が犠牲になるものなどが存在する。そこで、安全にゲノム編集技術を用いるために標準化が必要であることから、TALENについて特異性と高効率を両立した改良型TALEN (platinum TALEN)法を開発して、公的プラスミド供給機関 Addgene から配布されるようにした。これにより全世界の研究者が同一手法で実験可能になった。

ゲノム上の望みの位置に遺伝子導入（遺伝子ノックイン）することは、現在でも容易ではない。従来は、遺伝子ノックインするためには挿入する遺伝子カセットの他に、5'および3'側に数 kb の相同配列を持つドナーベクターを構築する必要があるが、この過程が研究開発のボトルネックになっているため、簡便にゲノム編集を利用して遺伝子ノックインができる手法の開発を行い、5~25bp 程度のごく短い相同配列を用いて可能な手法 PITCH 法を開発した。TALEN や CRISPR/Cas9 と組合せて簡便に遺伝子ノックインが可能になるものとして期待される。

Off-target の検討では、CRISPR/Cas9 と PITCH 法で作製した遺伝子ノックイン細胞クローンを用いて、標的部位と類似した配列の候補について 9 ヶ所シーケンス解析した結果、変異は導入されていないことが判った。

2. ゲノム編集でゲノムに起きる変化の解析

急速に普及しているゲノム編集技術の一つ CRISPR/Cas9 について、標的部位で起こる DNA2 本鎖切断の頻度、変化の程度、細胞周期の影響、オフターゲット効果、染色体（テロメア末端融合）に与える影響について検討した。その結果、Cas9 やガイド RNA プラスミド導入量を必要最小限で行うことにより、標的配列から想定される約 20 ヶ所の部位に off-target 切断は認められなかった。標的部位で起きる変化は、多くは数塩基から数十塩基の欠失を中心に、頻度は低いが 1,2 塩基の挿入や置換も検出された。その他に、 10^{-4} から 10^{-5} の頻度で 100 bp から 20 kb の大きな欠失も観察された。このような大きな欠失が off-target 部位で起きた時に検出できるかが、安全性を欠くにする上でのデータ解析時において重要である。

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 は、急速に普及している。遺伝子組換え作物の開発過程では、後代交配で望まない挿入配列（たとえば、Cas9 をコードする配列）を分離除去することが行われる。しかし、望む改変部位と望まない挿入配列が同一染色体上にあるなどして除去できない場合もある。新品種の開発促進に重点が置かれた場合には、安全上問題ないと考えられる配列の除去が行われられない可能性も否定出来ない。そのため、Cas9 の毒性やアレルギー性についての知見を得るために、熱安定性や人工胃液など消化液中での分解性試験を検討した。その結

果、Cas9 は消化液中で速やかに分解すること、加熱で容易に分解すること、加熱で僅かに残存する熱変性 Cas9 も消化液中で速やかに分解した。アレルゲンデータベース検索の結果から、既知のアレルゲンタンパクと相同性のある配列はなく、アレルゲン性や毒性を発現する可能性はないか、あっても極めて少ないと考えられた。

3. ゲノム編集を用いて外来遺伝子ノックインした時の周辺遺伝子発現レベルの変化について

ゲノム編集技術は、ゲノム上のあらゆる塩基配列を標的に DNA 導入を可能にする。しかし、遺伝子導入に伴う周辺内在性遺伝子発現への影響については、十分な知見はない。強力なプロモーターを含む遺伝子カセットを、モデル標的領域としてグロビン遺伝子クラスター領域へ導入してその周辺遺伝子発現量を比較解析した結果、最大 4 オーダー上昇した。また、2 つの遺伝子を導入した場合、内在性遺伝子と同方向に導入した場合では大きく上昇したが、逆方向に導入した場合の変化は検出されなかった。このことから、外来遺伝子をノックインする場合は、そのゲノム上の位置および方向が重要であり、挿入位置周辺の遺伝子発現量を広く比較検討する必要がある。特に、現在代謝に関連する成分を安全性の検討項目にあるが、変化する発現量変化の大きい遺伝子産物が検討項目にない場合は、現在の方法では確認できていない。安全性確認のための項目事項の再検討も必要かもしれない。

3. 安全性未承認遺伝子組換え食品検知への全ゲノムシーケンシング技術の応用

遺伝子組換えパパイアをモデル作物として、次世代シーケンス解析を活用することにより、迅速に未知配列を解析して系統特異的検知法を開発可能であることを明らかにした。

4. TALEN を導入した遺伝子組換えイネの作製と検出法の検討

モデル作物として、*SPK* 遺伝子および *FLO2* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子を導入したイネの作出を試みた。目的遺伝子の改変体を得ることはできなかったが、*SPK* 遺伝子を標的とした TALEN 遺伝子導入イネを用いて検知法を検討した。その結果、*CaMV35S* プロモーター、TALEN コンストラクト内部配列 (TALE・C・FokI) 及び、コントロールとしたイネ *SPS* 遺伝子のいずれを標的として、*SPK*-TALEN モデルイネから明瞭な増幅産物を与え、検出可能であることを示した。

5. ゲノム編集作物の開発状況

ZFN を用いた作物の報告は、TALEN や CRISPR/Cas9 に比べて少ない。TALEN 及び CRISPR/Cas9 について、CRISPR/Cas9 の報告数が 2013 年から 2014 年、そして 2015 年と毎年倍増している。TALEN の報告数の伸びは低調であり、ゲノム編集技術では手法が簡便な CRISPR/Cas9 が中心と考えられた。開発告別では、米国と中国が二大 NBT 大国となっている。中国においては、TALEN や CRISPR/Cas9 の実施対象植物として、イネに対する実施報告数が全体の 3 割~5 割を占めるが、大豆やトウモロコシ、コムギ、コメといっ

た実用作物への応用も検討されており、今後の動向に注意が必要である。

6. 非食用組換え作物の開発状況

研究開発が進んでいる高栄養、高機能または医薬品類を生産する遺伝子組換え（GM）植物や環境浄化を目的とする GM 植物、さらに食用作物を使用した工業用の GM 植物は、外見上は通常の作物と変わらないため見分けがつかず、外国では一般圃場栽培も行われている。そのため、上記作物の開発状況及び実態を調査し、把握しておくことは、食品の安全性確保の観点からも非常に重要である。

開発状況では、2015年の国別の件数は、中国 38 件が最も多く、次いで韓国 21 件、米国 19 件が続いた作物別集計では、食用作物はイネ 14 件が最も多かった。非食用作物では、タバコ 21 件が最も多く、シロイヌナズナ 10 件であった。その他には、薬用植物（トウゴマ、ヒガンバナ科植物など）も治療薬開発として開発が行われている現状が判明した。

7. 接ぎ木を用いた次世代遺伝子組換え技術による作物の作出とその安全性評価

接ぎ木を利用した遺伝子サイレンシングでは、産生されるタンパクはないが、移行先で機能する siRNA が存在する。そのため、遺伝子組換え台木または穂木から産生される siRNA が穂木または台木に移行するが、その程度移行するか、最終産物には siRNA は残存するかが、安全性を考える上で重要である。本研究では、穂木に導入した遺伝子の台木への転入性と、台木に篩管離輸送された siRNA 量とその残存性を解析した。さらに、台木における siRNA 標

的配列以外の相同配列であるオフターゲット候補部位へのメチル化の影響も解析した。その結果、導入遺伝子は台木には移行しないこと、siRNA は接ぎ木が成立している間は台木へ輸送されるが、一旦接ぎ木体から分離されると siRNA は消失して検出できないこと、オフターゲット候補遺伝子にはメチル化が起こらないことを明らかにした。

D. 結論

次世代組換え技術（新規育種法 NBT）について、本研究では、ゲノム編集、ODM、接ぎ木を中心に実験的な検討を行い、安全に用いるためのゲノム編集技術の開発標準化を行った。ゲノム編集を用いた時のオフターゲット変異、遺伝子ノックインの影響や染色体異常など安全性に関する研究から、食品用途として考えた場合に懸念されるものはなかった。接ぎ木を用いた転写型遺伝子サイレンシング誘導で、最終産物（ジャガイモ）には低分子 RNA は残存しないことから、安全上問題になることはないと考えられた。動物の他、植物でゲノム編集を利用した研究（大豆、トウモロコシ、コムギ、コム）が活発になり 5 年程度で商品化される可能性が示唆された。その他の GM 食品では、機能性食品の開発報告が多かった。また、次世代組換え技術に対する見解を簡単にまとめ、分担報告書および分担総合報告書-近藤担当分に記載した。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

各分担研究報告欄に記した。

G. 知的財産権の出願。登録状況

なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「次世代バイオテクノロジー技術応用食品等の安全性確保に関する研究」
平成 25～27 年度 総合分担研究報告書

接ぎ木を用いた次世代遺伝子組換え技術による作物の作出とその安全性評価

研究分担者 原田竹雄 弘前大学 農学生命科学部

研究要旨

本研究では、報告者らが開発し、国立大学法人弘前大学農学生命科学部が保有する特許技術「台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法「国際出願番号 PCT/JP2011/07815」によって作出されたエピゲノム編集ジャガイモの食品等の安全性確保に関する解析を行った。特定の siRNA を産生するコンストラクトを導入した組換えタバコを穂木とし、それをジャガイモ既存品種の台木に接ぎ木した場合、篩管長距離輸送された siRNA が台木から形成された塊茎に転写型サイレンシングが引き起こされる。この技術はこれまでにない新育種法である。そこで、穂木に導入した遺伝子の台木への転入性と、台木に篩管長距離輸送された siRNA 量とその残存性を解析した。さらに、台木における siRNA 標的配列以外の相同配列であるオフターゲット候補部位へのメチル化の影響も解析した。その結果、導入遺伝子は台木には転入しないこと、siRNA は接ぎ木が成立している間は台木へ輸送されるが、接ぎ木体から分離されると siRNA は消失すること、オフターゲット候補遺伝子にはメチル化が起こらないことが判明した。

研究協力者 葛西厚史 弘前大学 農学生命科学部

A. 研究目的

人工的に特定の siRNA を産生するコンストラクトを導入したタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を穂木として、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) を台木とした接ぎ木個体においては、その siRNA を接ぎ木点を介して台木へ篩管輸送させることができる。そこで、この接ぎ木法と siRNA 篩管輸送能を組み合わせることで、台木の細胞ゲノムの特定配列に RdDM (RNA directed DNA Methylation) を起こさせ、結果的にその標的配列にメチル化を誘導できる。

この場合のターゲット配列を特定遺伝子の 5' 隣接領域とした場合には、転写型遺伝子サイレンシング (TGS: Transcriptional Gene Silencing) が起動される。TGS は一般に娘細胞にも安定して維持されることから、この組織からの再生個体は TGS となる。報告者らはこの方法でジャガイモのエピゲノム編集体を作成した。本技術では組換え体 (GM) を穂木に、これまでの優良品種を台木とする接ぎ木が培養器の中の培養シュート間で行われることから、GM 個体と非 GM 個体との接ぎ木、すなわち

Trans-Grafting であり、これを RdDM と融合させた新育種技術である。

接ぎ木点を介して導入遺伝子の DNA は輸送されることはないとの報告がある。また、人工的産物の siRNA がごく少量のみ接ぎ木相手に輸送されるとする報告もある。しかし、これらの報告例は少なく、また、詳しい解析はこれまでに殆どない。そこで、タバコ/ジャガイモの Trans-Grafting におけるこれらの問題を検討した。

B. 研究方法

siRNA 産生タバコの作出

ジャガイモ品種 ‘ワセシロ’の遺伝子 *GBSSI* (*Granule-bound starch synthase I*) の 5'隣接領域 (+202~537) を逆位反復配列として、伴細胞特異的プロモーター下でドライブするコンストラクト CoGBSSI_pBIR (図 1、表 1) を作製した。このプラスミドを保持したアグロバクテリウムをタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉切片に共存培地で 2 日間感染させ、選抜のために抗生物質カナマイシン (100 mg/l) とアグロバクテリウム殺菌のために抗生物質オージェメンチン (ペニシリン系; 375 mg/l) を含む培地で耐性遺伝子が導入された細胞を選抜し、再分化体を獲得することにより、CoGBSSI_pBIR 導入タバコ再分化当代 (T0) を作出した。この T0 タバコを閉鎖系隔離温室で栽培し、自殖種子 (T1 系統群) を得た。これらの種子をカナマイシン (400 mg/l) を含む MS 培地に播種し、発芽個体におけるカナマイシン抵抗性と感受性の分離比からおおよその宿主内に導入されたコピー数を推定した。さらに、成長した個体を隔離温室または特定網室で栽培し、自殖

後代の種子 (T2 世代群) を得た。これらの種子を再度カナマイシンを含む MS 培地に播種、抵抗性と感受性に分離しない系統を選抜して、これを siRNA (small interfering RNA) 供与タバコとした。

接ぎ木体とエピゲノム編集体の作出

MS 培地に播種後 1 カ月の siRNA 供与タバコ (T2 世代以降) を頂芽から 2~3 cm 下部を水平に切断し穂木とした。一方、継代 2 週間後のジャガイモ培養シュートを少なくとも 1 つの腋芽が残るように根元から 2~3 cm で水平に切断して台木とした。この両者を切れ目を入れたシリコンチューブ (5 mm 程度、内径 1 mm×外径 2 mm) 内で切断面が揃うように密着させた。24°C、暗所にて 3 日間生育させた後、長日条件下 (L16, D8) にて育成した。その 1 ヶ月後、接ぎ木が成立した個体において腋芽から伸びたジャガイモシュートを切除し、さらに 2~3 カ月間育成し、この接ぎ木個体をマイクロチューバー (MT) 誘導培地 (MS80, BAP 5 μM) に移植し、18°C、暗所にて 1 ヶ月間育成したところ、接ぎ木個体のジャガイモ台木に MT が形成された。

この過程において、siRNA が穂木から篩管を通して台木に輸送、台木の一部組織で *GBSSI* の TGS が誘導、その組織から TGS が持続するジャガイモ MT (エピゲノム編集体) を形成させた。

small RNA 輸送とその残存性

次世代シーケンス ((株) 北海道システムサイエンス社に発注) を通して導入遺伝子 CoGBSSI_pBIR の逆位反復配列から産生された siRNA について解析した。次世代シー

ケンスの供試材料は、35S:GBSSpIR を導入したジャガイモ (系統 t33)、接ぎ木個体のジャガイモ台木からの側枝およびそこから誘導したエピゲノム編集 MT 由来の継代培養体とした (図 2)。siRNA 解析においては RNA3' 末端に連結されたアダプター配列を解析対象サンプルのリード配列から除去した後、リード配列の長さにより分類し、それらの集計を行った。その後、ターゲット領域のセンス鎖とアンチセンス鎖それぞれの配列にマッピングし、位置情報についても解析した (図 3)。さらに、各サンプルはリード母数が異なることから、100 万リードあたりのリード数 (R/M) を求めた。

C. 研究結果

導入遺伝子の接ぎ木相手への転入

Trans-grafting において導入遺伝子が接ぎ木相手に転入することはないとの報告例がある。本研究の台木ジャガイモにおいても穂木へ導入したプラスミド DNA の存在は検出されなかった。すなわち、図 4 において示したようにターゲット領域 e の内在性遺伝子領域を除いて、ノパリン遺伝子のプロモーター領域 a、nptII 遺伝子領域 b などのように、導入遺伝子の 6 部位においては PCR 増幅はなかった。部位 e においてジャガイモで 2 本のバンドが得られたが、それぞれは対立遺伝子 (ターゲット領域では 4 か所の Indel が存在) 由来の産物であることを塩基配列から確認した。以上の結果より、穂木に導入した CoGBSSIpBIR の DNA は台木には転入することは無いと判断された。

台木への small RNA 輸送量とその残存性

オウトウ (Sweet Cherry) において病原ウイルスゲノムの一部の siRNAs 産生ベクター導入形質転換体を台木にした場合、接ぎ木相手の栽培種オウトウ穂木にはおよそ 100 万リードあたり 10 リードの siRNAs が検出され、この穂木はウイルスに対して抵抗性を有すると報告された。そこで、本エピゲノム編集ジャガイモに関しても、次世代シーケンス解析を通して siRNAs の輸送性と残存性等を調査した。ベクター内 GBSSIpB 配列にマッピングされる siRNA 数を解析して、接ぎ木を介した輸送性、台木に輸送された siRNA の残存性を 1 塩基ミスマッチを許容して行った。

35S:GBSSpIR 導入体系統 t33 には 20~24 nt が 2169/100 万リード存在した。一方、接ぎ木 3 週間後と 7 週間後における台木ジャガイモから生育した側枝には、それぞれにおいて 100 万リードあたり 153/100 万リードおよび 138/100 万リードが検出された (表 2、図 5)。そして、エピゲノム編集 'ワセシロ' の継代シュートでは 0.28/100 万リードであり、野生型 'ワセシロ' (Ws) は 0.51/100 万リードより低い値が得られた。

オフターゲット候補についての解析

標的配列以外の相同塩基配列が認識されて、その配列にメチル化が誘導される可能性がある。このようなオフターゲット候補が今回の実験系においてメチル化が起きるかどうかを検討した。GBSSIpB から産生されたターゲット配列由来の siRNA (377 タイプ) を最新のジャガイモデータベース (Potato Genomics Resource V4.03; <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>)

に対しマッピングしたところ、1つの siRNA (0.15 リード / 100 万リード) が 54 か所のオフターゲット候補を有していた。これらのオフターゲットサイト候補を比較したところ、いずれも 14 bp のコア配列と SSR (AAG / CTT) からなりその近傍 10 bp 程度まで相同性が高かった (図 6 A)。この 54 か所のうち遺伝子内 (機能未知、イントロン) に存在する 2 つのオフターゲット候補の遺伝子座についてメチル化度を調査したところ、供試品種‘ワセシロ’では第 5 染色体上に完全一致のオフターゲット候補が、第 4 染色体上には SSR が少ないことからターゲット配列の 5' 端 2 塩基を欠く配列が存在した (図 6 B)。この両領域のメチル化度を比較したところ、両者とも野生型との間に有意差は認められなかった (図 6 C)。

D. 考察

エピゲノム編集ジャガイモの葉より得た DNA に対する PCR 解析において、導入遺伝子のほぼ全域をカバーする 6 部位の増幅が認められないことから、タバコに導入した遺伝子はジャガイモ台木に転入しないと判断された。Trans-grafting においては、接ぎ木相手に DNA の転入は起こらないとする報告例は複数あるが、本研究においてもこの点が再確認された。

RNA の種類によっては逆転写されてゲノムに挿入されることもありうるが、24 塩基長のような短い RNA がそのような結果になったとの報告例はない。RNA 分子が逆転写されてゲノムに挿入される最少のものとしては、可動性レトロトランスポゾン (SINE ; short interspersed nuclear element) が知られているが、そのサイズは

120 塩基前後である。RNA 分子はプライミングが無くても逆転写しうる (その RNA 自身の 2 次構造がプライミングとして働く) が、20 塩基前後の RNA がそのようになるといった知見は無い。

一方、siRNA の接ぎ木相手への輸送量は接ぎ木開始 3 週目と 7 週目のそれぞれにおいて、150/100 万リード前後が確認された。このことは、接ぎ木個体においては siRNA が接ぎ木相手にコンスタントに輸送されるが累積は無いと言える。また、エピゲノム編集体では輸送された siRNA はほとんど確認されないレベルであることから、分解・消失していることが判る。small RNA の turnover に関しては、シロイヌナズナでは SDN1 と命名された 3'→5' exonuclease がその役割の一部を担っていることが報告されている。分解速度に関しては miRNA はその機能上早い turnover を必要とすることから数時間で分解されるものもあるが、本来は安定的な分子であり数日間の存在も知られている。siRNA についての報告例は未だないが miRNA と同様であると推測される。

siRNA 配列と相同なオフターゲット候補配列が存在しても、それがターゲット配列と同じレベルでメチル化修飾が行われなかったことが判った。この場合、メチル化修飾されたのち脱メチル化酵素などの働きにより結果として脱メチル化状態に戻る可能性もある。一方、メチル化の結果、遺伝子がサイレンシングされるエピゲノム編集が成立する要素としては、その配列の質、すなわちプロモーター領域であり CG・CHG・CHH 数や cis エレメントとの配置関係、さらに、サイレンシングを誘導する閾値を越

えたメチル化修飾をもたらすには、十分な siRNA 数が必要条件であると考察される。さらに RdDM の分子メカニズム上から考えると、ターゲット配列は RNA ポリメラーゼ IV による転写物が存在して、これと siRNA との相同二本鎖 RNA を介して足場 (scaffold) が形成される必要がある。このことから、単に配列が相同であることでオフターゲット現象起こる CRISPR/ Cas9 によるゲノム編集の場合とは明らかに異質であると言える。

接ぎ木によるエピゲノム編集ジャガイモの獲得法は、従来の形質転換法やゲノム編集とは異なり、塩基配列情報の書き換えは一切なく、また、外来 siRNA による塩基配列改変の可能性も極めて低く、機能した siRNA は分解・消失する。また、エピゲノム編集ジャガイモに siRNA 産生用導入遺伝子は転入することはない。なにより、接ぎ木そのものは歴史ある栽培技術であり、接ぎ木相手に遺伝子が転入して接ぎ木相手のゲノムに挿入されたとする報告はなく、Trans-grafting においてもその危険性を議論する余地は無いと判断される。

本技術はターゲット配列の逆向き繰り返し構造を伴細胞で特異的に転写させ、それを接ぎ木するまでは人為的なものであるが、その後の siRNAs の産生と篩管輸送、ターゲット配列のメチル化は植物が有する本来のシステムによって実行されたものである。また、プロダクトベースの考え方に基づけば、本技術による作出体は遺伝子組換え作物等ではないと判断される。「エピゲノム編集体を非遺伝子組換え作物等として取り扱うべき」とする論文がヨーロッパ科学アカデミー協議会 (EASAC) 議長およびドイツ

の植物バイオテクノロジー安全協会から発表されている。

なお、本エピゲノム編集ジャガイモの栽培を文部科学省に申請したところ、2016年2月1日に文部科学省において開催された「研究開発段階の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の申請に係る学識経験者からの意見聴取会合 (平成 27 年度第 1 回)」において、「この栽培試験の試料は、遺伝子組換え生物等の第一種使用規程に該当するものではない」と有識者および文科省と環境省によって判定されている。

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atclac/news/16/02/04/00052/?ST=academic>

E. 結論

本研究では Trans-grafting によって作出されたエピ編集ジャガイモについて、食品としての安全性の観点から、予想される問題点を解析したところ、遺伝子組換え体から接ぎ木相手側に導入遺伝子は転入しないこと、導入遺伝子から人工的に産生された siRNA はその少量が接ぎ木が成立する間は輸送され続けるが、累積が認められないことから、分解・消失が起こり、接ぎ木体から分離されたエピゲノム編集体では、輸送された siRNA は残存しないことが判明した。

F. 研究発表

論文発表

Kasai A, Harada T. Epimutant Induction as a New Plant Breeding Technology. JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly) 49: 301-305 (2015)

学会発表

- 1) 原田 竹雄：台木と穂木間で行われる遺伝情報の輸送. 平成 27 年度寒冷地果樹研究会, 平成 28 年 2 月 9 日, 東北農業研究センター
- 2) 葛西厚史・北條初音・原田竹雄：接ぎ木を利用したエピゲノム編集によるジャガイモの高品質化. 日本育種学会, 平成 28 年 3 月 21 日, 横浜市立大学

G. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称：台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法

特願 2012547865

国際出願番号：PCT/JP2011/07815

【資料】

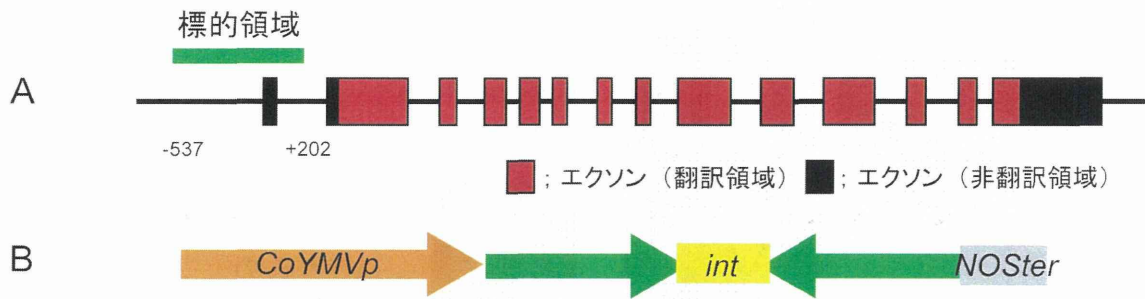


図1 siRNA 供与体として用いたタバコ穂木に導入した遺伝子。

A ; ジャガイモ ‘ワセシロ’ の *GBSSI* 遺伝子、B ; *CoGBSSIpBIR*

表1 供与核酸構成要素のサイズと機能

構成要素	サイズ (kb)	由来および機能
ジャガイモ顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 5'隣接配列 (<i>GBSSI</i> ; <i>Granule-bound starch synthase I</i>)	0.6	ジャガイモ由来。アミロースの合成酵素をコードする遺伝子のプロモーターを含む5'隣接配列。
ツククサ黄色斑紋ウイルスプロモーター (<i>CoYMVp</i>)	1	ツククサ黄色斑紋ウイルス由来。伴細胞特異的プロモーター (引用文献8)。
<i>CAT1</i> イントロン (<i>int</i>)	0.3	トウゴマ由来。カタラーゼ遺伝子のイントロン。逆向き繰り返し配列間のスペーサーとして利用。
<i>Nos</i> プロモーター (<i>NOSpro</i>)	0.3	<i>Rhizobium radiobacter</i> 由来。ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列。
<i>NPTII</i> 遺伝子 (<i>NPT II</i>)	0.8	トランスポゾン Tn5 由来 <i>neomycin phosphotransferase II</i> 遺伝子。抗生物質カナマイシンに耐性を示す。遺伝子組換え体の選抜マーカー。
<i>Nos</i> ターミネーター (<i>NOSter</i>)	0.3	<i>Rhizobium radiobacter</i> 由来。ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。転写終結を規定する。

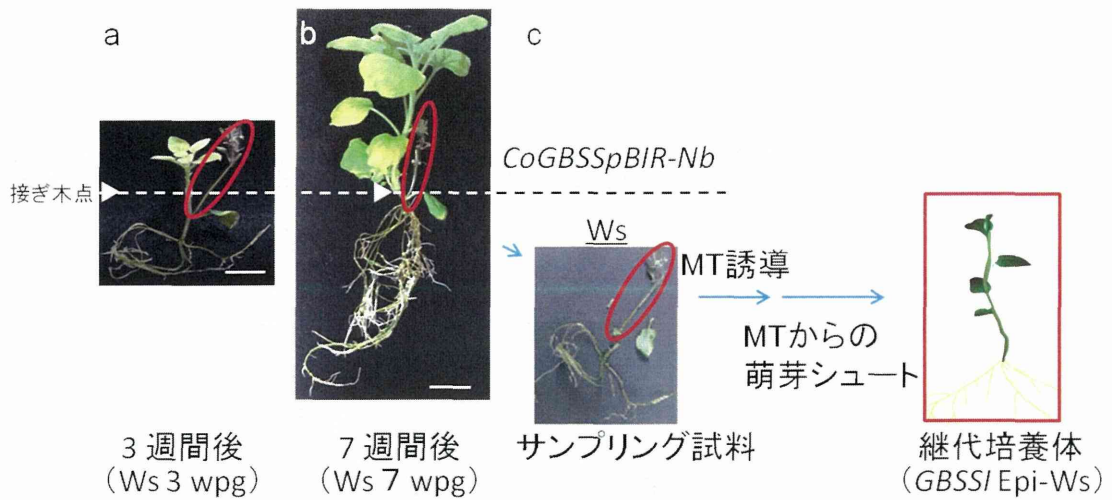


図2 *CoGBSSIpBIR-Nb* に関する siRNAs の輸送と残存についての次世代シーケンス解析。a, b ; 接ぎ木3週間後と7週間後の接ぎ木個体。c ; 試料とした側枝とその継代培養体 (赤枠内)。各試料は 15 個体以上をバルクとした (白線= 1 cm)

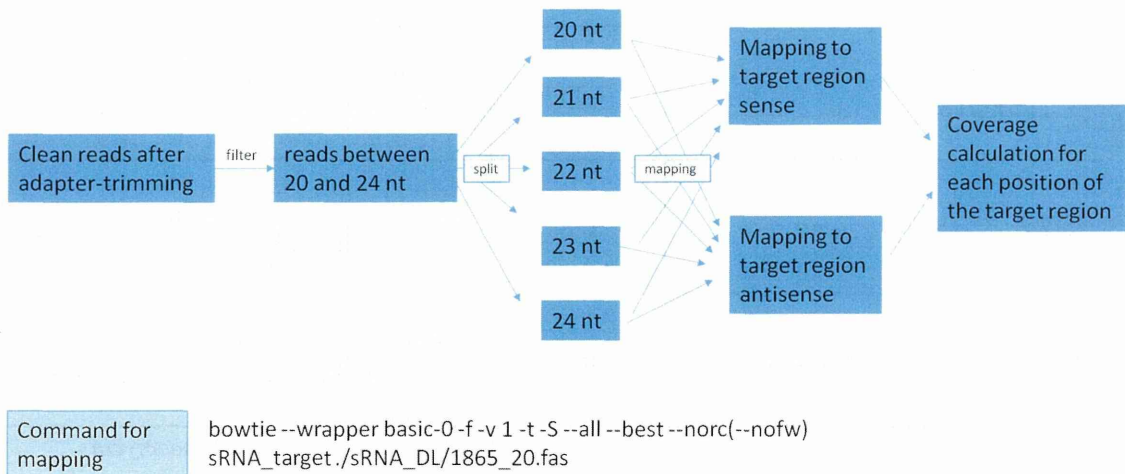


図3 次世代シーケンスによるターゲット領域の siRNA に関する解析法

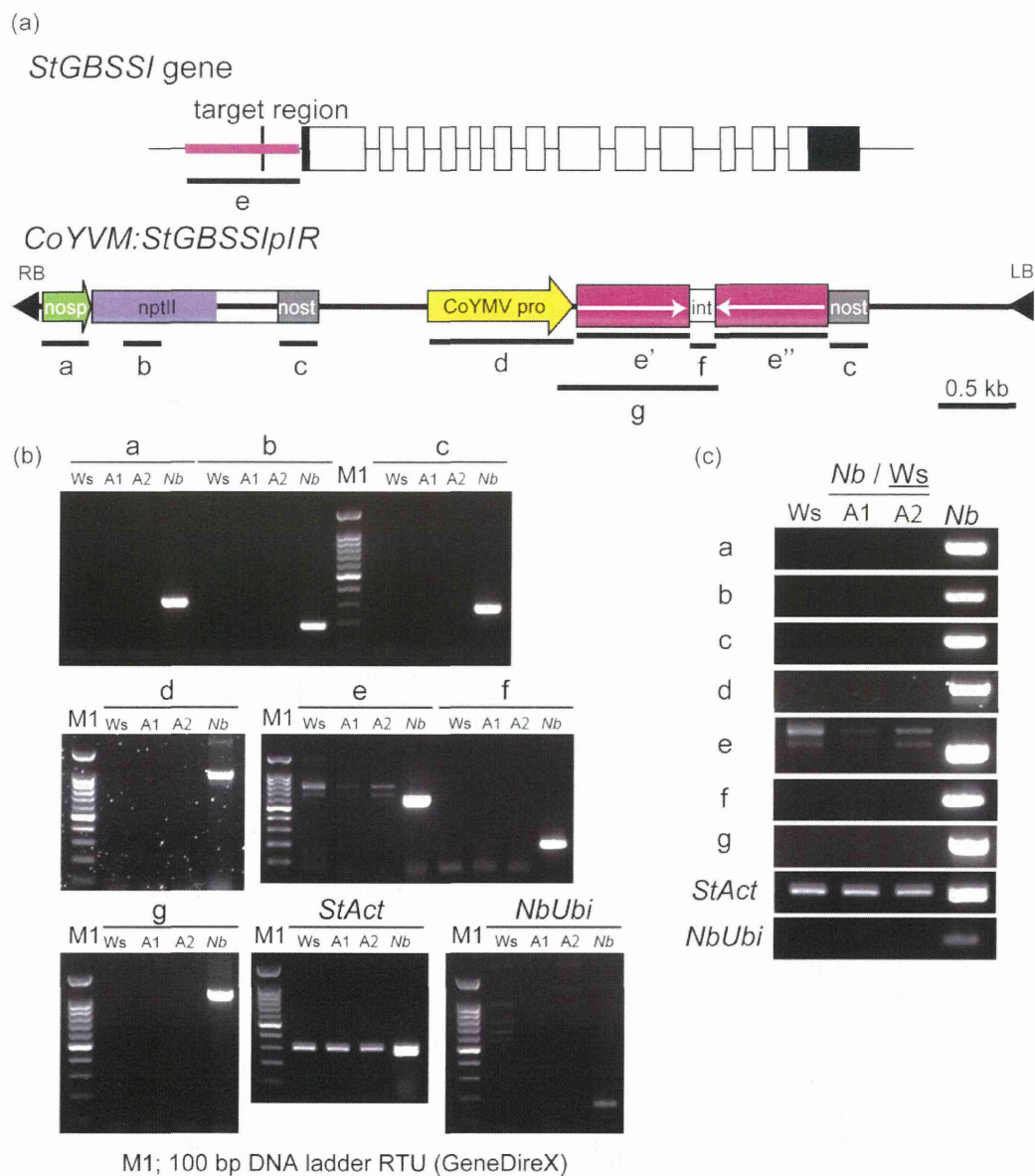


図4 *GBSSI*メチル化修飾ジャガイモにおける gPCR 解析。

(a) ジャガイモ *StGBSSI* 遺伝子 (上) および *CoYVM:StGBSSI pIR* に設定した PCR 増幅領域の模式図(下)。(b) *GBSSI*メチル化修飾ジャガイモにおける T - DNA 各領域の gPCR 解析。‘ワセシロ (Ws)’ と siRNA 供与体とした形質転換タバコ (*Nb*) および *GBSSI*メチル化修飾ジャガイモ 2 系統 (A1, A2) のゲノム DNA を鋳型として設定したプライマー(表 4) により PCR 増幅を試みた。(c) PCR 産物ごとに整理して表したもの。*StAct* はジャガイモのアクチン遺伝子。*NbUbi* は本実験で用いたタバコのユビキチン遺伝子。e の 2 本のバンドがあるのは対立遺伝子に由来する。

表2 検出された標的配列に対する siRNA 量の実数

	35S:GBSSpIR t33	Co GBSSpBIR-Nb / Ws* 3 wag**	Co GBSSpBIR-Nb / Ws 7 wag	GBSSI Epi-Ws	WT-Ws
Total reads	13,628,750	11,650,432	12,599,867	14,208,462	11,856,368
20 nt (R/M***)	67.14	4.46	3.97	0.00	0.17
21 nt (R/M)	1552.09	30.30	32.22	0.07	0.00
22 nt (R/M)	382.79	74.93	59.92	0.00	0.00
23 nt (R/M)	35.07	2.92	3.17	0.00	0.08
24 nt (R/M)	132.81	14.16	12.30	0.00	0.17
Total (R/M)	2169.90	126.78	111.59	0.07	0.34

*ジャガイモ品種 ‘ワセシロ’

**接ぎ木後の週

***リード/100万リード

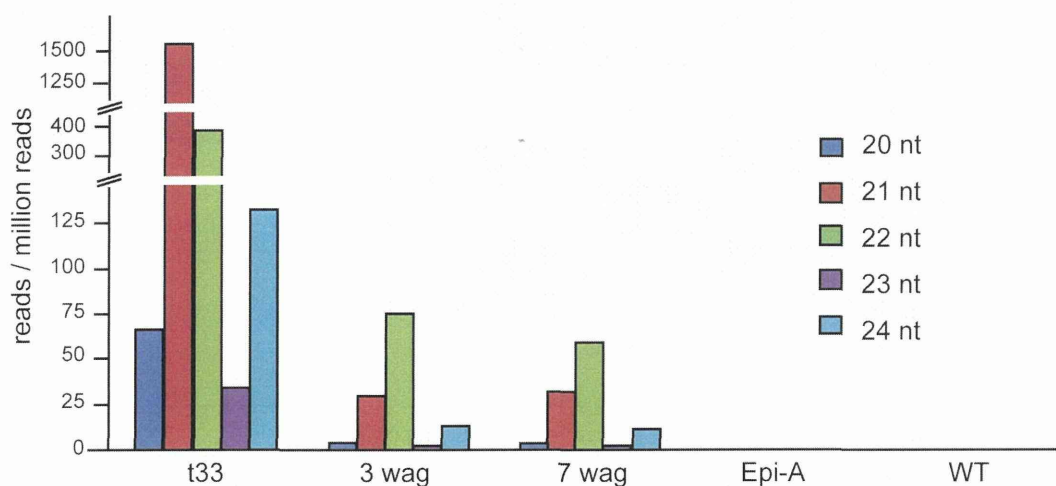


図5 検出された各サンプルにおける siRNA (表2を図式化)。